

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
**4 juillet 2002 (04.07.2002)**

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 02/051856 A2**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :**  
**C07H 21/00, C07B 61/00,**  
**C07F 7/18, G01N 33/53, C12Q 1/68**

Françoise [FR/FR]; 22 boulevard Edouard Rey, F-38000 GRENOBLE (FR). HOANG, Antoine [FR/FR]; 26 avenue Félix Esclangon, F-38000 GRENOBLE (FR).

**(21) Numéro de la demande internationale :**  
**PCT/FR01/04112**

**(74) Mandataire :** LEHU, Jean; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

**(22) Date de dépôt international :**  
20 décembre 2001 (20.12.2001)

**(81) États désignés (national) :** JP, US.

**(25) Langue de dépôt :** français

**(84) États désignés (régional) :** brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

**(26) Langue de publication :** français

**Publiée :**  
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

**(30) Données relatives à la priorité :**  
00/16940 22 décembre 2000 (22.12.2000) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31/33, rue de la Fédération, F-75752 PARIS (FR).

**(72) Inventeurs; et**  
**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** VINET,



**A2**

**(54) Title: METHOD FOR IMMOBILISING PROBES, IN PARTICULAR FOR PRODUCING BIOCHIPS**

**(54) Titre : PROCEDE D'IMMOBILISATION DE SONDES, EN PARTICULIER POUR REALISER DES PUCES BIOLOGIQUES**

**(57) Abstract:** The invention concerns a solid support comprising sites designed to immobilise oligonucleotide probes or proteins or biological cells provided with ligands, the sites being provided with species bound to the support by a chemical binding function. The species exhibit a diol group bound to the support by an alkyl chain. The invention is applicable to biochips.

**WO 02/051856**

**(57) Abrégé :** L'invention concerne un support solide comportant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques ou de protéines ou de cellules biologiques munies de ligands, les sites étant pourvus d'espèces chimiques accrochées au support par une fonction chimique d'accrochage. Les espèces chimiques présentent un groupe diol lié au support par une chaîne alkyle.

**PROCEDE D'IMMOBILISATION DE SONDES, EN PARTICULIER POUR  
REALISER DES PUCES BIOLOGIQUES**

**DESCRIPTION**

**5 DOMAINTE TECHNIQUE**

L'invention concerne un procédé d'immobilisation de sondes en particulier pour réaliser des puces biologiques. Elle permet la fabrication de biopuces à oligonucléotides dont le greffage sur un support solide est réalisé par l'intermédiaire d'une liaison covalente.

**ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE**

Les biopuces peuvent être réalisées par synthèse parallèle d'oligonucléotides directement sur un support solide. Dans ce cas, il existe une limitation du procédé liée à la pureté des sondes synthétisées. En effet, aucune purification après synthèse n'est possible. Ceci engendre la présence sur le support solide de séquences tronquées de longueur (n-1) mères pour une longueur visée de n. Cette technique est adaptée à des puces de haute densité (supérieure à 1000 sondes), dont les sondes ont une longueur comprise entre 6 et 20 mères. Les applications visées dans ce cas, sont le séquençage et le criblage (ou "screening" en anglais) du polymorphisme simple de nucléotide (SNP).

Une autre voie est l'immobilisation de sondes. Dans ce cas, les sondes sont présynthétisées et peuvent donc être purifiées. Deux types d'immobilisation de sondes oligonucléotides se

présentent. Une sonde purifiée peut être fixée sur un support solide soit par adsorption, soit par greffage via une réaction spécifique entre la sonde et le support.

5 L'adsorption de la sonde sur le support est un phénomène passif puisque des liaisons de type électrostatique établies entre le squelette phosphodiester de la sonde chargée négativement et le support modifié portant des charges positives  
10 interviennent de façon non covalente dans l'immobilisation de la sonde. Ce type d'immobilisation est compatible avec des longueurs de sondes comprises entre 70 et quelques centaines de mètres.

Par contre, dans le cas d'un greffage de la  
15 sonde par réaction spécifique, le phénomène est dit actif, car il est dû à la réactivité et à la spécificité entre la fonction branchée sur la sonde et celle introduite sur le support solide. Ce mode  
20 d'immobilisation établit par conséquent des liaisons de type covalent entre la sonde déposée et le support utilisé. Il est compatible avec des longueurs de sondes comprises entre 6 et 50 à 60 mètres.

L'immobilisation de sondes oligonucléotidiques met en œuvre un couple de fonctions chimiques  
25 branchées sur la sonde et le support. Cette notion de couple de fonctions chimiques s'appuie sur la réactivité entre un nucléophile et un électrophile.

Il existe donc plusieurs possibilités de fonctionnalisation, c'est-à-dire d'apport des fonctions chimiques sur la sonde et sur le support. On peut ainsi utiliser une sonde nucléophile sur un support

électrophile, une sonde électrophile sur un support nucléophile, une sonde nucléophile sur un support également nucléophile mais en présence d'un bras di-électrophile, et une sonde électrophile sur un support 5 également électrophile mais en présence d'un bras di-nucléophile.

Les sondes rendues nucléophiles par une fonction amine sont les plus répandues. En effet, cette fonction est stable et est très accessible 10 commercialement.

Différentes étapes sont nécessaires à l'obtention des plots fluorescents correspondant aux hybridons, produits issus de l'appariement entre deux simples brins d'ADN complémentaires.

15 L'obtention d'un support fonctionnalisé pour biopuce à immobilisation de sondes nécessite 3 étapes principales :

- le nettoyage de la surface du support devant présenter les sites réactifs,

20 - la silanisation de cette surface,  
- l'activation des sites.

Ces étapes sont suivies de 3 autres étapes qui vont conduire à l'acquisition des signaux de fluorescence :

25 - l'immobilisation des sondes sur les sites,

- l'hybridation des sondes,  
- la lecture.

On distingue principalement deux voies 30 d'introduction de sites d'ancre des sondes sur le support à partir desquels des fonctions chimiques

seront créées ultérieurement. Ces sites sont soit nucléophiles, soit électrophiles. Ils sont apportés lors de l'étape de silanisation.

A titre d'exemple, la figure 1 représente un site nucléophile constitué par une fonction amine rattachée à un support par un silane.

Des supports pour biopuces actuellement disponibles présentent des sites électrophiles par apport d'une fonction aldéhyde. Ils permettent l'accrochage des sondes rendues nucléophiles par une fonction amine.

La figure 3 représente un schéma d'obtention d'une fonction aldéhyde sur un support solide à partir d'une fonction amine couplée avec un bras dialdéhyde.

Les supports pour biopuces offrant une fonction aldéhyde et actuellement connus présentent les inconvénients suivants.

Ils nécessitent un intermédiaire de couplage (voir la figure 3), ce qui diminue la densité finale de sites d'accrochage des sondes.

Leur stockage pose problème, la forme aldéhyde étant relativement peu stable. En effet, il a été observé que les supports doivent être utilisés immédiatement après l'ouverture de la boîte qui les contient.

Le groupement  $\text{NH}_2$  initialement sur le support (voir la figure 3) peut être transformé en  $\text{NH}_3^+$ , ce qui favorise l'adsorption de composés non spécifiques. Il en résulte une augmentation du bruit de fond des biopuces.

**EXPOSÉ DE L'INVENTION**

Afin d'apporter une solution aux inconvenients présentés par l'art connu, il est proposé selon la présente invention d'obtenir une fonction aldéhyde (permettant l'immobilisation d'une sonde) par transformation d'un époxyde en passant par un diol.

Un premier objet de l'invention consiste en un support solide constitué par un substrat comportant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques ou de protéines ou de cellules biologiques munies de ligands, les sites étant pourvus d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, caractérisé en ce que les espèces chimiques présentent un groupe diol lié au support par une chaîne alkyle.

La figure 2 représente un site électrophile constitué par une fonction époxyde rattachée à un support par un groupe silane disposé au bout d'une chaîne alkyle. La chaîne alkyle est exempte d'oxygène.

Un tel support présente l'avantage de pouvoir être stocké sans problème pendant six mois, la forme diol étant plus stable que la forme aldéhyde.

Le substrat peut être en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

De préférence, la fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le support est une fonction silane.

Un deuxième objet de l'invention consiste en un support solide constitué par un substrat comportant des sites activés pour l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques ou de protéines ou de

cellules biologiques munies de ligands, les sites étant pourvus d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, les espèces chimiques comportant un groupe aldéhyde destiné à 5 l'immobilisation desdites sondes, caractérisé en ce que le groupe aldéhyde est un groupe obtenu par oxydation d'un diol porté par une chaîne alkyle. La chaîne alkyle évite, avant l'étape d'oxydation, la présence d'oxygène sur le lien entre la fonction diol et le groupe 10 d'accrochage sur le support.

Le substrat peut être en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique revêtu ou non d'une couche d'accrochage.

De préférence, la fonction chimique 15 d'accrochage des espèces chimiques sur le support est une fonction silane.

Un troisième objet de l'invention consiste en une biopuce comprenant un support solide constitué par un substrat comportant des sites activés comme 20 défini ci-dessus, des sondes oligonucléotidiques ou des protéines, ou des cellules biologiques munies de ligands étant immobilisées sur les sites activés grâce à une liaison covalente entre les fonctions aldéhyde du support solide et des fonctions amine portées par les 25 sondes.

Un quatrième objet de l'invention consiste en un procédé de fabrication d'un support solide présentant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques ou de protéines ou de 30 cellules biologiques munies de ligands, comprenant les étapes suivantes :

- nettoyage d'une surface d'un substrat,  
- définition desdits sites par mise en place, sur la surface nettoyée, d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique  
5 d'accrochage, les espèces chimiques comportant un précurseur destiné à former une fonction aldéhyde permettant l'immobilisation des sondes, des protéines ou des cellules biologiques munies de ligands,  
caractérisé en ce que le précurseur est une fonction  
10 époxyde et est traité pour donner un groupe diol, le précurseur époxyde étant disposé au bout d'une chaîne alkyle.

Avantageusement, le traitement pour donner un groupe diol est une hydrolyse acide de l'époxyde.

15 L'étape de nettoyage peut consister à nettoyer une surface d'un substrat en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

De préférence, la fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le substrat est  
20 une fonction silane.

Le procédé peut comporter en outre une étape consistant à oxyder le diol pour obtenir un aldéhyde.

Un cinquième objet de l'invention consiste  
25 en un procédé de fabrication d'une biopuce, comprenant :

- la fabrication d'un support solide présentant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques ou de protéines ou de  
30 cellules biologiques munies de ligands selon le procédé ci-dessus,

- l'immobilisation des sondes oligonucléotidiques ou des protéines ou des cellules biologiques munies de ligands par liaison covalente entre les fonctions aldéhyde du support solide et des fonctions amine (ou oxyamine) portées par les sondes en position 5' ou 3'.

#### **BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS**

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture 10 de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- la figure 1, déjà décrite, représente un site nucléophile constitué par une fonction amine 15 rattachée à un support par un silane,

- la figure 2, déjà décrite, représente un site électrophile constitué par une fonction époxyde rattachée à un support par un silane,

- la figure 3, déjà décrite, représente un schéma d'obtention d'une fonction aldéhyde sur un support solide, selon l'art connu,

- la figure 4 représente un schéma d'obtention d'une fonction aldéhyde sur un support solide, selon l'invention,

- la figure 5 est un schéma montrant la fonction diol en position vicinale,

- la figure 6 est un schéma montrant le mécanisme de complexation du periodate de sodium sur un diol,

- la figure 7 est un schéma montrant la fonctionnalisation d'un substrat silanisé par le procédé de l'invention.

## 5 DESCRIPTION DETAILLEE DE MODES DE REALISATION DE L'INVENTION

La figure 4 est un schéma d'obtention d'une fonction aldéhyde sur un support solide à partir d'une fonction époxyde hydrolysée en diol puis oxydé en aldéhyde, selon l'invention. L'époxyde utilisé est par exemple du glycidoxypropylépoxyde triétoxysilane.

Cependant, les inventeurs de la présente invention ont constaté qu'après les étapes de nettoyage, de silanisation, d'activation puis d'hybridation, les résultats de fluorescence des plots d'hybridation sur le support sont peu encourageants. Ceci n'est pas dû à l'étape d'hybridation puisque des manipulations parallèles effectuées sur des lames commerciales et des lames aminées, ont donné de meilleures intensités de signaux.

Les inventeurs ont donc remis en cause, non pas les étapes de nettoyage ou de silanisation (qui sont efficaces en synthèse *in situ*), mais plutôt l'étape d'activation, c'est-à-dire lors de la transformation de la fonction époxyde en aldéhyde et plus précisément, l'oxydation du diol vicinal du silane en aldéhyde.

La figure 5 est un schéma montrant la fonction diol en position vicinale.

Il en résulte qu'avec un époxyde sans oxygène sur la chaîne alkyle qui porte le groupe, l'oxydation doit avoir lieu.

La figure 6 est un schéma montrant le 5 mécanisme de complexation du periodate de sodium sur un diol.

Pour vérifier leur hypothèse, les inventeurs ont utilisé un silane portant une fonction époxyde liée par une chaîne alkyle (en l'absence donc 10 d'oxygène sur cette chaîne).

La figure 7 est un schéma montrant la fonctionnalisation d'un substrat silanisé selon l'invention.

Après les différentes étapes de la chaîne réactionnelle, on a obtenu des plots de fluorescence saturés sur fond noir, ce qui confirme l'hypothèse des inventeurs.

L'invention présente plusieurs avantages par rapport à l'état de la technique et plus 20 particulièrement par rapport aux substrats de type aldéhyde actuellement commercialisés.

L'invention n'utilise pas d'intermédiaire de couplage qui diminue la densité finale de sites d'accrochage des sondes. Le signal de fluorescence 25 obtenu est plus important dans le cas de l'invention. On observe un facteur 10 dans des conditions expérimentales identiques.

Comme mentionné plus haut, l'invention permet de stocker les supports solides sous la forme 30 diol qui est particulièrement stable.

L'invention permet aussi de minimiser le bruit de fond des biopuces puisqu'il n'y a pas de groupement permettant des interactions électrostatiques.

5 La préparation des supports selon l'invention est transposable à d'autres techniques de réalisation de biopuces par exemple la synthèse *in situ*.

A titre d'exemple, après ouverture de  
10 l'époxyde en diol, le silane selon l'invention a été utilisé pour réaliser la synthèse *in situ* d'oligonucléotides sur un support solide. On a mis en œuvre la chimie phosphoramidite couramment utilisée pour la synthèse des oligonucléotides sur billes de  
15 verre dans des synthétiseurs automatiques du type Expedite 8909. Le protocole de synthèse utilisé est décrit dans le document Caruthers (Sciences, octobre 1985, page 28) 1. Il comporte les étapes de couplage, d'acétylation, d'oxydation et de détritylation, ces  
20 étapes étant itérées pour permettre la synthèse d'oligonucléotides dont la séquence est déterminée par la base (A, T, G ou C) portée par le nucléotide phosphoramidite.

La première étape de couplage se fait entre  
25 un 2'-déoxy-5'-O-diméthoxytrityl-3'-O-(β-cyanoéthyl N,N-diisopropylamino) phosphoramidite et le diol du support. Les couplages suivants ont lieu entre les nucléotides comportant des bases différentes. Une séquence de 20 mères a été effectuée : 3' TTTTT ATC TCA  
30 CAC AAA TAG Cy3 5'. En fin de synthèse un marqueur

fluorescent Cy3 a été introduit en utilisant comme précédemment la chimie phosphoramidite.

Les signaux de fluorescence mesurés sur un microscope à épifluorescence Olympus BX80 après 5 excitation à 550 nm montrent une augmentation d'un facteur 4 à 5 fois supérieur à ceux obtenus dans le cas d'un silane comportant un oxygène sur la chaîne alkyle.

**REVENDICATIONS**

1. Support solide constitué par un substrat comportant des sites destinés à l'immobilisation de 5 sondes oligonucléotidiques ou de protéines ou de cellules biologiques munies de ligands, les sites étant pourvus d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, caractérisé en ce que les espèces chimiques présentent un groupe diol lié 10 au support par une chaîne alkyle.

2. Support solide selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substrat est en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

15

3. Support solide selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le support est une fonction silane.

20

4. Support solide constitué par un substrat comportant des sites activés pour l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques ou de protéines ou de cellules biologiques munies de ligands, les sites étant 25 pourvus d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, les espèces chimiques comportant un groupe aldéhyde destiné à l'immobilisation desdites sondes, caractérisé en ce que le groupe aldéhyde est un groupe obtenu par oxydation 30 d'un diol porté par une chaîne alkyle.

5. Support solide selon la revendication 4, caractérisé en ce que le substrat est en un matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique revêtu ou non d'une couche d'accrochage.

5

6. Support solide selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce que ladite fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le support est une fonction silane.

10

7. Biopuce, caractérisée en ce qu'elle comprend un support solide selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, des sondes oligonucléotidiques ou des protéines ou des cellules biologiques munies de ligands étant immobilisées sur les sites activés grâce à une liaison covalente entre les fonctions aldéhyde du support solide et des fonctions amine portées par les sondes.

20

8. Procédé de fabrication d'un support solide présentant des sites destinés à l'immobilisation de sondes oligonucléotidiques ou de protéines ou de cellules biologiques munies de ligands, comprenant les étapes suivantes :

25

- nettoyage d'une surface d'un substrat,  
- définition desdits sites par mise en place, sur la surface nettoyée, d'espèces chimiques accrochées au substrat par une fonction chimique d'accrochage, les espèces chimiques comportant un précurseur destiné à former une fonction aldéhyde

30

permettant l'immobilisation des sondes, des protéines ou des cellules biologiques munies de ligands, caractérisé en ce que le précurseur est une fonction époxyde et est traité pour donner un groupe diol, le 5 précurseur époxyde étant disposé au bout d'une chaîne alkyle.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le traitement pour donner un 10 groupe diol est une hydrolyse de l'époxyde.

10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'étape de nettoyage consiste à nettoyer une surface d'un substrat en un 15 matériau choisi parmi le verre, le silicium et le plastique.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que la 20 fonction chimique d'accrochage des espèces chimiques sur le substrat est une fonction silane.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comporte 25 en outre une étape consistant à oxyder le diol vicinal pour obtenir un aldéhyde.

13. Procédé de fabrication d'une biopuce, caractérisé en ce qu'il consiste à :  
30 - fabriquer un support solide présentant des sites destinés à l'immobilisation de sondes

oligonucléotiques ou de protéines ou de cellules biologiques munies de ligands selon le procédé de la revendication 12,

- immobiliser des sondes oligonucléotidiques, des protéines ou des cellules biologiques munies de ligands par liaison covalente entre les fonctions aldéhyde du support solide et des fonctions amine portées par les sondes, les protéines ou les cellules biologiques munies de ligands en position 5' 10 ou 3'.

1 / 4

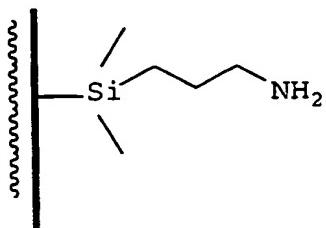


FIG. 1

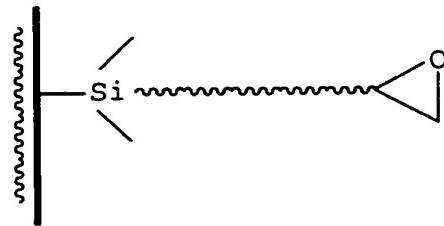


FIG. 2

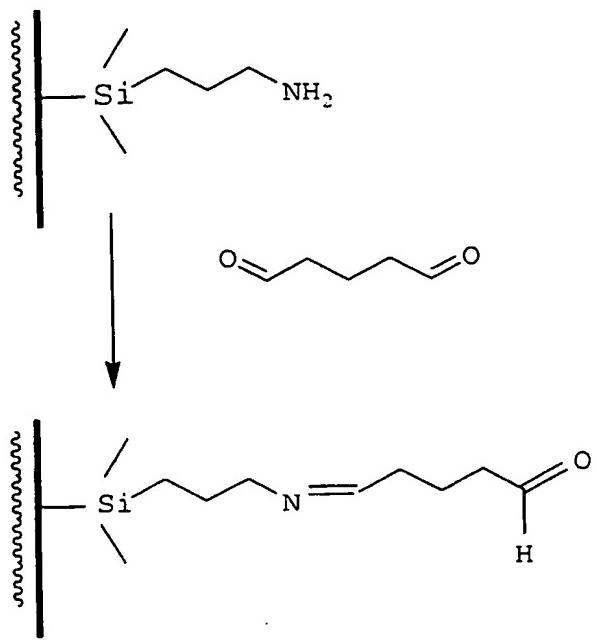


FIG. 3

2/4

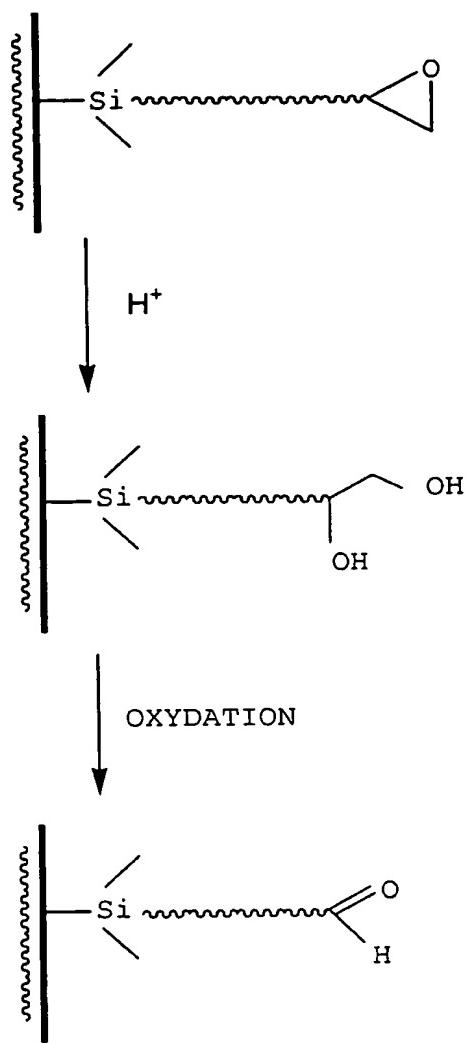
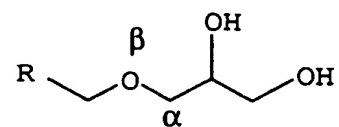
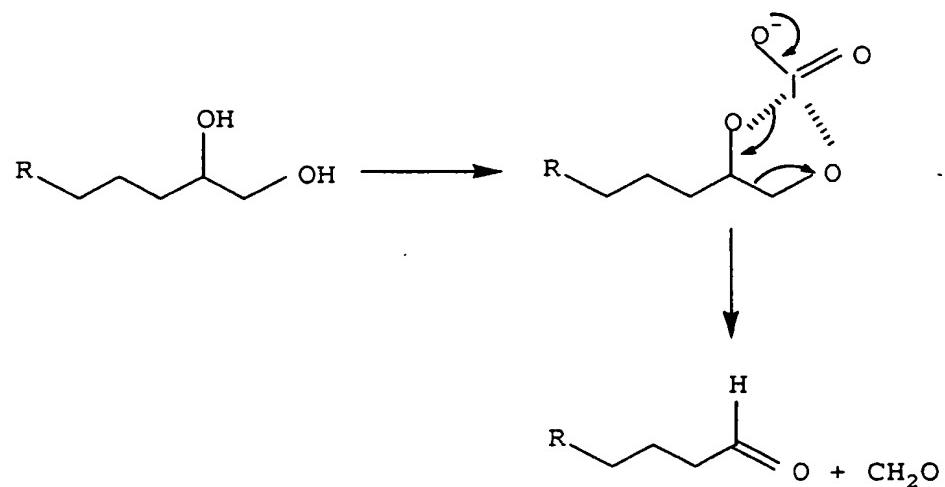


FIG. 4

**3 / 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**

4 / 4

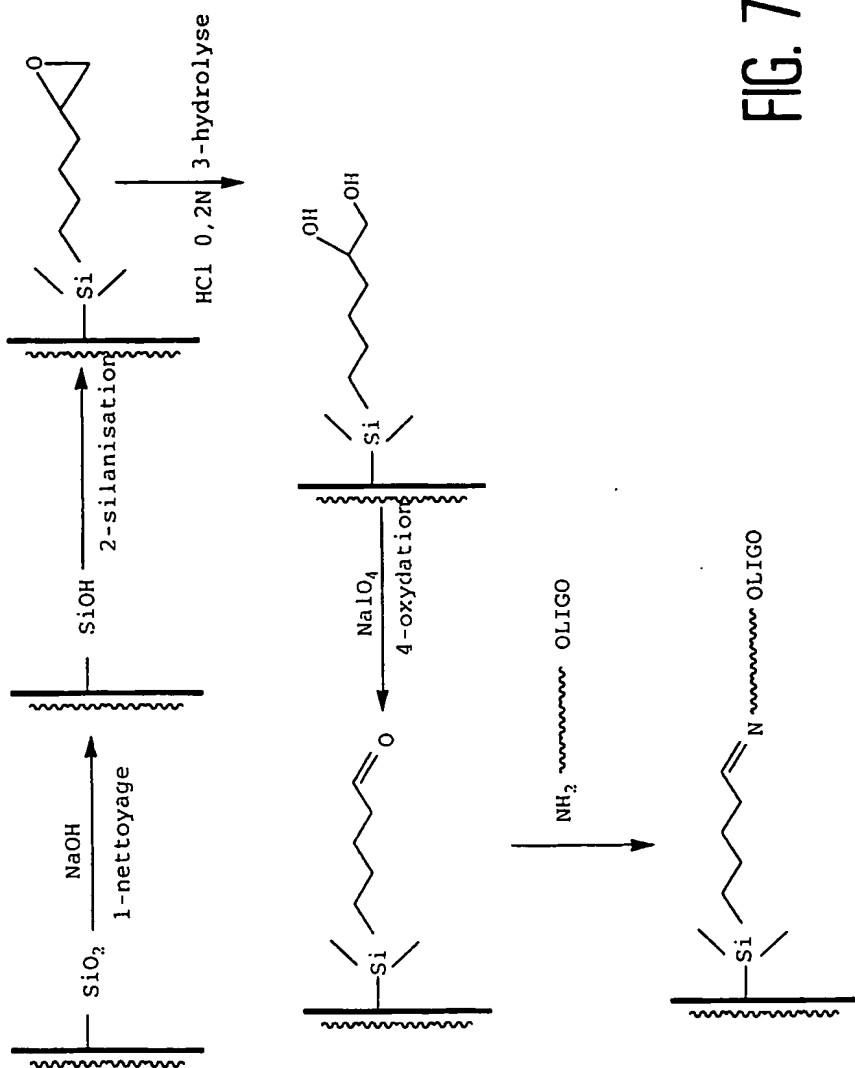


FIG. 7